

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.01037

## 猪 *CuZnSOD* 基因的克隆、表达及功能分析

杜金芳, 曾勇庆, 陈伟, 崔景香, 陈其美, 杨伦, 胡艳霞

山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018

**摘要:** 为了进一步了解和认识 *CuZnSOD* 基因的结构和功能, 揭示 *CuZnSOD* 对猪抗氧化机能的影响, 寻找与肉质性状相关联的分子标记, 文章采用 RACE(Rapid amplification of cDNA end)方法, 对莱芜猪 *CuZnSOD* 基因 cDNA 进行克隆测序, 分析其结构和功能, 并用 Real-time PCR 检测 *CuZnSOD* 基因的表达。结果表明, *CuZnSOD* 基因 cDNA 序列全长 658 bp(GenBank 登录号: GU944822), 包含 76 bp 的 5' UTR 和 120 bp 的 3' UTR 序列。全部 CDS 序列 462 bp, 编码 153 个氨基酸, 分子量为 15.9 kDa, 等电点为 6.03。*CuZnSOD* 基因编码的氨基酸序列中, 第 3 氨基酸残基处存在 1 个 O-糖基化位点, 第 86 氨基酸残基处存在 1 个 N-糖基化位点。二级结构中  $\alpha$  螺旋仅占 1.31%。在进化过程中高度保守, 与人、牛、小鼠和褐鼠的编码区同源性分别为 87.74%、87.66%、83.44% 和 83.23%; 氨基酸序列同源性分别为 90.26%、94.12%、92.21% 和 91.50%。*CuZnSOD* 存在典型的金属结合配体结构域(GFHVHQFGDNT)。基于蛋白序列所构建的分子进化树表明猪与牛的亲缘关系最近。在 mRNA 水平上, *CuZnSOD* 是一个广谱表达基因, 在大脑、心脏、脾脏、肝脏、肾脏、肺、大肠、小肠、脊髓、肌肉、背膘和胃中都能检测到, 其在肾脏、小肠和肺中表达量较高, 在心脏和肌肉组织中表达量较低。

**关键词:** 猪; *CuZnSOD*; 基因克隆; 表达分析

## Cloning, expression and functional analysis of *CuZnSOD* gene in swine

DU Jin-Fang, ZENG Yong-Qing, CHEN Wei, CUI Jing-Xiang, CHEN Qi-Mei, YANG Lun, HU Yan-Xia

College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

**Abstract:** In order to understand the structure and function of *CuZnSOD* gene, reveal the effect of the anti-oxidant in swine, and find the molecule marker correlated with meat traits, the cDNA of *CuZnSOD* gene was cloned and sequenced from muscle of Laiwu black swine by RACE (rapid amplification of cDNA end) techniques. The structure and function of *CuZnSOD* were analyzed by bioinformatics, and the gene expression profile in different tissues was examined by real-time PCR. The results showed that the full sequence of *CuZnSOD* cDNA is 658 bp (GU944822), containing 76 bp sequence of 5' UTR and 120 bp sequence of 3' UTR, and coding region (CDS, 462 bp) encodes 153 amino acids. The isoelectric point (pI) of the protein is 6.03, and the molecular weight is 15.9 kDa. There were one O-glycosylation site at the third amino acid and one N-glycosylation site at the eighty-fourth amino acid. The percentage of alpha helix was 1.31%. The alignment similarities of the CDS sequence of swine *CuZnSOD* with those of cattle, human, rat, and mouse were 87.74%, 87.66%, 83.44%, and 83.23%, and the similarities of amino acid sequence were 90.26%, 94.12%, 92.21%, and 91.50%, respectively. *CuZnSOD* possesses the typical metal binding ligands (GFHVHQFGDNT). The phylogenic tree based on *CuZnSOD* pro-

收稿日期: 2010-05-18; 修回日期: 2010-06-05

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2008AA101008), 国家转基因重大专项(编号: 2008ZX08006-002), 山东省农业良种工程重大项目(编号: 2009LZ012-03)和山东省自然科学基金项目(编号: Y2008D32)资助

作者简介: 杜金芳(1985-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种学。E-mail: yuzhongdexiao@126.com

通讯作者: 曾勇庆(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种学。Tel: 0538-8196883; E-mail: yqzeng@sdau.edu.cn

tein sequence detected the closest relationship between swine and cattle. *CuZnSOD* mRNA is a broad-spectrum expression gene, which was detected in brain, heart, spleen, liver, kidney, lung, large intestine, small intestine, spinal cord, muscle, backfat, and stomach. In particular, high expression levels of *CuZnSOD* mRNA were detected in kidney, small intestine and lung, but low expressions were observed in heart and muscle tissues.

**Keywords:** swine; *CuZnSOD*; gene cloning; expression analysis

随着现代饲养业集约化程度的不断提高,氧化在商品猪生产中的危害已大量显现,可负面影响活体动物的免疫机能和宰后肉质特性等。抗氧化酶可缓解或者抑制自由基的负面效应,提高商品猪的抗氧化能力,进而改善商品猪的肉质<sup>[1]</sup>。正常的细胞代谢可产生超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )等活性氧(ROS),过多的自由基如果不能被及时清除,它们将会攻击各种生物大分子,引起DNA损伤、酶失活、脂质过氧化等一系列氧化损伤,进而引起生物体各种生理病变<sup>[2-5]</sup>。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是生物抗氧化系统中抗氧化酶类的重要成员,是生物体有效清除活性氧的第一个重要抗氧化酶类,它将超氧阴离子自由基快速歧化为 $H_2O_2$ 和 $O_2$ ,进一步在过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的作用下转化为 $H_2O$ 和 $O_2$ <sup>[6]</sup>。

CuZnSOD(Copper zinc superoxide dismutase)是超氧化物歧化酶(SODs)家族的成员之一,是集体防御氧化损伤的一种重要的金属酶,能转移性地清除超氧阴离子自由基,在维持氧自由基平衡方面起着重要的作用<sup>[7]</sup>。它广泛存在于细胞内,并且占总SOD的90%。经鉴定*CuZnSOD*基因存在于一百多个属中,例如鼠、牛、猪等<sup>[8]</sup>。哺乳动物中,*CuZnSOD*在肺、肾、胰脏和胎盘等多种组织中表达<sup>[9-11]</sup>,其分布与功能有关。猪*CuZnSOD*的完整编码区和全长cDNA序列尚未见报道。本研究以莱芜猪为实验对象,对*CuZnSOD*进行克隆、表达及功能分析,旨在进一步探索猪*CuZnSOD*基因的结构和功能,为揭示CuZnSOD对猪抗氧化机能的影响,以及寻找与肉质性状相关联的分子标记提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

在同样饲养管理条件下饲喂至  $114 \pm 2$  kg 体重的莱芜猪,随机屠宰9头,迅速采集大脑、心脏、脾脏、

肝脏、肾脏、肺、大肠、小肠、脊髓、肌肉(腰部背最长肌)、背膘和胃12种组织,液氮速冻,  $-70^\circ C$  保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取

12种组织各取100 mg样品在无RNA酶的离心管中匀浆后使用Trizol法提取总RNA,采用1%的琼脂糖凝胶电泳验证RNA的完整性。 $-70^\circ C$  保存备用。

#### 1.2.2 引物设计

采用Primer 5.0引物设计软件,根据AF396674序列设计猪*CuZnSOD*基因3' RACE的两条下游引物和5' RACE的两条上游引物、常规PCR的一对引物(扩增片段217 bp),引物序列见表1。根据AF017079.1序列设计*GAPDH*扩增引物,扩增片段为100 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

#### 1.2.3 逆转录

cDNA 第一链:取肌肉组织的总RNA 2  $\mu L$ ,以Oligo-d (T)<sub>18</sub>(50  $\mu mol/L$ )为引物,用M-MLV(Biotake公司)反转录合成,其他操作按照说明进行。3' RACE的cDNA 第一链:取肌肉组织的总RNA 2  $\mu L$ ,以P1和P4为引物(10  $\mu mol/L$ ),用SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase试剂盒(Invitrogen, America)合成cDNA。5' RACE的cDNA 第一链:取肌肉组织的总RNA 2  $\mu L$ ,以P7和P8(10  $\mu mol/L$ )为特异性引物,用SuperScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase试剂盒(Invitrogen, America)合成cDNA。

#### 1.2.4 PCR 扩增

以合成的cDNA 第一链为模板,应用引物P9和P10扩增CDS中间片段。PCR扩增体系为50  $\mu L$ 。扩增条件:95  $^\circ C$  预变性2 min; 95  $^\circ C$  变性30 s, 55  $^\circ C$  复性30 s, 72  $^\circ C$  延伸1 min, 35个循环;最后再72  $^\circ C$  延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5' 3')
3' RACE	P1: GAAGTCGTTTGGCCTGTGGTGTAAT
	P2: GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT
	P3: CTTGGGCAGAGGTGGAAATGAAG
	P4: GACTCGAGTCGACATCGAT
5' RACE	P5: GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGG
	P6: GGATTCAAGATTGAAGTGAGGACC
	P7: GGCCACGCGTCGACTAGTACG
	P8: CTAACACTGTCTTCTCTCCCTTCA
<i>CuZnSOD</i>	P9: GGTCTCACTTCAATCCTG
	P10: CTTCAATTCCACCTCTGC
<i>GAPDH</i>	P11: ACTCACTCTTCTACCTTTGATGCT
	P12: TGTTGCTGTAGCCAAATTCA

1.2.5 RACE 扩增

以 3'RACE 的 cDNA 第一链为模板, P2 和 P3 为引物扩增 3' UTR 序列。以 5' RACE 的 cDNA 第一链为模板, P5 和 P6 为引物扩增 5' UTR 序列。扩增条件为: 95 预变性 2 min; 95 变性 30 s, 55 复性 30 s, 72 延伸 1 min, 35 个循环; 最后再 72 延伸 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 目的基因的克隆、测序和序列分析

将 PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 分别回收 RT-PCR、3' RACE 和 5' RACE 产物, 用 DNA 回收试剂盒(Tiagen 公司)将产物纯化回收目的片段。取回收产物 4.5  $\mu$ L, 加入 0.5  $\mu$ L pMD18-T 载体(Biotake 公司), 温和混匀后加入 5  $\mu$ L Solution I, 16 连接过夜; 取 5  $\mu$ L 连接产物, 加 *E.coli* DH5a(Tiagen 公司)感受态细胞 33  $\mu$ L, 冰浴 30 min, 42 热冲击 90 s, 冰浴 2 min, 加入 800  $\mu$ L LB 液体培养基, 37 摇床放置 45 min 后将菌液铺在 LB 固体培养基上, 37 生化培养箱中过夜; 挑取克隆菌落进行摇菌, 用 M13 引物进行菌液 PCR 鉴定分离出有目的带的小管, 取 10  $\mu$ L 至试管中, 加 3 mL LB 液体培养基, 1.8  $\mu$ L AMP+, 封口 37 摇菌 12 h 后菌液测序。另一部分用质粒酶切鉴定, 再测序。

1.2.7 序列分析和结构预测

将获得的序列在 NCBI 上用 ORF Finder 程序进行开放阅读框预测, 同时将序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 初步比较分析, 利用 ProtParam 在线工具 Translate(<http://au.expasy.org/tools/dna.html>) 推测编码蛋白质的氨基酸组成; 使用在线软件 Compute pI/MW

([http://au.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html)) 分析猪 *CuZnSOD* 的等电点(pI)、理论分子量; 使用在线软件 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分别对猪 *CuZnSOD* 氨基酸序列进行结构功能域分析; 从 NCBI 蛋白数据库中下载人、牛、褐鼠和小鼠的 *CuZnSOD* 氨基酸序列, 利用软件 DNAMAN 进行序列编辑和比对分析, 利用 MEGA4.0 PAM 矩阵模型计算不同物种 *CuZnSOD* 的遗传距离, 应用邻接法(NJ)建立系统进化树。

1.2.8 Real-time PCR

采用SYBR Green染料法, 在Stratagene Mx3000P 荧光定量PCR仪上进行反应。以*GAPDH*基因作为内参<sup>[12]</sup>, 定量分析*CuZnSOD*基因mRNA表达的组织差异。*CuZnSOD*基因Real-time PCR反应体系: 2  $\mu$ L cDNA, 2  $\mu$ L Plus Solution, 10  $\mu$ L SYBR Green, P9 和 P10 各 2  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L), 补ddH<sub>2</sub>O至 20  $\mu$ L。*GAPDH*基因Real-time PCR反应体系: 2  $\mu$ L cDNA, 2  $\mu$ L Plus Solution, 10  $\mu$ L SYBR Green, P11 和P12 各 1.2  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L), 补ddH<sub>2</sub>O至 20  $\mu$ L。PCR反应条件: 95 预变性 30 s; 95 变性 5 s, 58 复性 10 s, 72 延伸 15 s, 40 个循环; 最后再 72 延伸 10 min。

检测中为每个待测样品cDNA设置 3 个重复, 对得到的 3 个Ct值取平均值, 用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法进行计算<sup>[13]</sup>。使用 SAS统计分析各组织的相对表达量, 以P<0.05 表示统计学差异。采用One-way ANOVA进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增

以莱芜猪肌肉组织的总 RNA 为模板, 应用引物扩增部分 CDS 序列 217 bp, 与预期片段大小相符。

3' RACE 扩增 *CuZnSOD* 基因 mRNA 的 3' UTR, 获得了 250 bp 的条带。5' RACE 扩增 *CuZnSOD* 基因 mRNA 的 5' UTR, 获得了 225 bp 的条带。经测序拼接后获得 *CuZnSOD* 基因 cDNA 全长为 658 bp (GenBank 登录号: GU944822), 包含 462 bp 的全部 CDS 区、76 bp 的 5' UTR 和 120 bp 的 3' UTR 序列。猪 *CuZnSOD* 基因 CDS 区长度为 462 bp, 包含起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG。

## 2.2 序列分析

对猪 *CuZnSOD* 基因编码的氨基酸多肽进行理化性分析, *CuZnSOD* 蛋白相对分子量为 15.9 kDa。通过 ComputeI/MW(ExPASy)分析其理论等电点  $pI=6.03$ 。亚细胞定位于细胞质, 没有跨膜区。*CuZnSOD* 氨基酸序列存在锚信号序列的概率为 0.00%, 存在信号肽的可能性为 0.20%。Gly45、Gly62、Pro75、Gly83 和 Gly139 为立体活性位点, His47、49、64 和 121 为铜结合位点, His64、72、81 和 Asp84、Gly142 为锌结合位点, Cys58 和 Cys147 是形成二硫键的残基, Arg144 是酶活性位点必须存在的残基。利用 NetNGlyc 1.0 及 NetOGlyc 3.1 对猪 *CuZnSOD* 进行 N-连接和 O-连接糖基化位点预测, 发现猪 *CuZnSOD* 氨基酸序列在第 3 位氨基酸残基处存在 1 个 O-糖基化位点, 第 86 位氨基酸残基处存在 1 个 N-糖基化位点。用 Netphos 2.0 预测基因的磷酸化位点发现在 59 和 107 位氨基酸有丝氨酸磷酸化位点, 28、34 和 96 位氨基酸有苏氨酸磷酸化位点, 但没发现有酪氨酸磷酸化位点。通过 HNN 进行二级结构预测显示,  $\alpha$  螺旋 1.31%, 无规则卷曲 60.13%。

将猪 *CuZnSOD* 基因编码区核苷酸序列分别与 GenBank 中人(NM\_000454.4)、小鼠(NM\_011434)、褐家鼠(NM\_017050)、牛(NM\_174615)的 *CuZnSOD* 基因进行比较, 通过 DNAMAN 计算序列的同源性分别为 87.74%、83.44%、83.23%、87.66%, 5 个物种的同源性为 92.81%。

从 NCBI 网站下载人(NP\_000445.1)、牛(NP\_777040.1)、褐家鼠(NP\_058746.1)和小家鼠(NP\_035564.1)*CuZnSOD*的氨基酸多肽序列, 对这些氨基酸多肽序列与猪*CuZnSOD*氨基酸多肽序列进行同源性分析(图 1), 猪*CuZnSOD*氨基酸多肽序列与牛的相似性最高, 为 94.12%, 与人、小鼠和褐鼠的相似性分别为 90.26%、92.21%、91.50%。基于不同物种*CuZnSOD*氨基酸序列以PAM矩阵模型计算不同物种的遗传距离, 并用NJ法构建分子系统发育树, 结果显示: 猪与牛亲缘关系较近, 与人、小鼠和褐鼠的亲缘关系相对较远。利用在线软件构件 3D-JIGSAW模型, 用Pymol软件对*CuZnSOD*蛋白三级结构进行观测分析的结果见图 2, 其中螺旋有 3 个, 转角有 20 个; Cys58 和Cys147 在两个相同的亚基之间形成二硫键, 将两个亚基结合成为功能蛋白。

## 2.3 *CuZnSOD*基因组织特异性表达分析

以 *GAPDH* 为内参基因, 大肠作为对照组织, 对猪 *CuZnSOD* 基因在 12 种组织中的表达进行定量分析。将所得 Ct 值代入公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算后得到 *CuZnSOD* 基因 mRNA 在不同组织中的相对表达规律(图 3)。*CuZnSOD* mRNA 在肾中表达量最高, 在小肠、肺、脑组织中表达量较高, 而在心脏和肌肉组织中表达量较低。

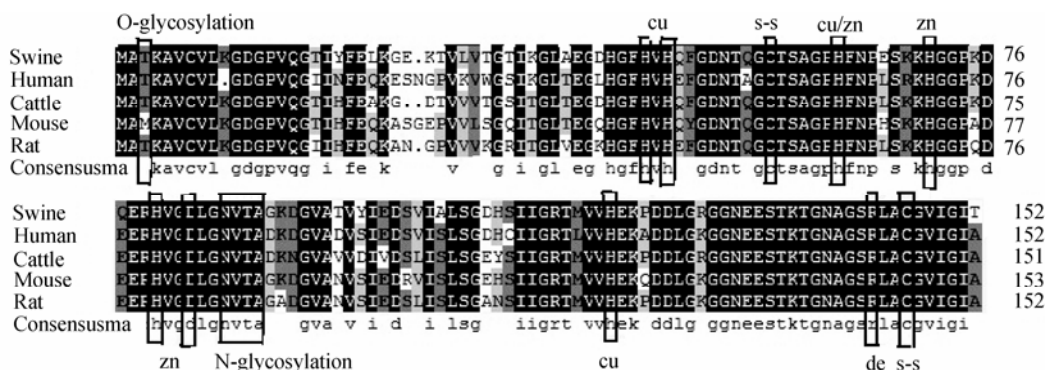


图 1 5 个物种的 *CuZnSOD* 氨基酸序列比对分析

O-glycosylation 为 O-糖基化位点, N-glycosylation 为 N-糖基化位点, cu/zn 为金属配体结构域, s-s 为二硫键形成的残基。

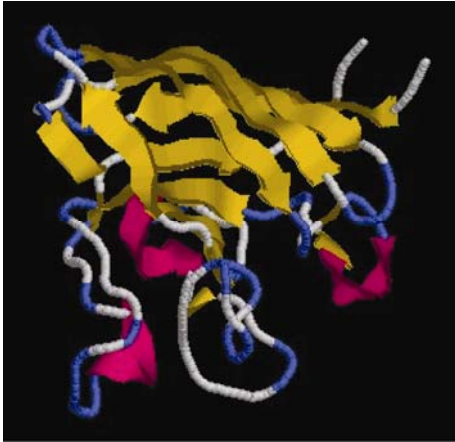


图 2 猪 *CuZnSOD* 蛋白三维结构图

### 3 讨论

*CuZnSOD* 是机体活性氧清除反应过程中发挥作用的抗氧化酶, 对防止氧自由基破坏细胞的组成、结构和功能, 保护细胞免受氧化损伤具有十分重要的作用。*CuZnSOD* 是“人体清道夫”, 在医学临床可以治疗多种疾病。Orr 曾将 *CuZnSOD* 基因导入果蝇, 导致转基因株具有多个复制的 *CuZnSOD* 基因, 从而寿命比野生型长 1/3<sup>[14]</sup>。本研究通过 RACE 技术成功克隆了 658 bp 的 cDNA 序列, 编码区序列为 462 bp, 编码 153 个氨基酸, 与其他物种一样氨基酸序列都有保守残基, 如与金属辅基相连的氨基酸残基、参与肽键内部二硫键形成部位附近的氨基酸残基和甘氨酸残基<sup>[15-17]</sup>, 它们的大量存在和均匀分布有利于形成酶分子的高级结构。其中, *CuZnSOD* 家族特征序列 1 (GFHVHQFGDNT, 44~54 氨基酸残基之间), 由组氨酸残基组成铜配体; 特征序列 2 (GNAGSRLACGY, 138~149 氨基酸残基之间), 由半胱氨酸残基形成二硫键。CDS 序列同源性分析, 与牛、人、小鼠和褐鼠的同源性分别是 87.66%、

87.74%、83.44% 和 83.23%, 氨基酸同源性分别是 94.12%、90.26%、92.21% 和 91.50%, 说明 *CuZnSOD* 在进化过程中具有较高的保守性。猪 *CuZnSOD* 没有信号肽, 亚细胞定位于细胞质, 这与人的 *CuZnSOD* 定位一致<sup>[18]</sup>。说明它是细胞质中的蛋白。

用 Netphos 2.0 预测基因的磷酸化位点发现在 59 和 107 位氨基酸有丝氨酸磷酸化位点, 28、34 和 96 位氨基酸有苏氨酸磷酸化位点, 但没发现有酪氨酸磷酸化位点。在应激过程中,  $O_2^-$  数量增加, 通过 G-CSF 调节细胞信号转导, 导致 *CuZnSOD* 翻译后的磷酸化, 从而降低体内 *CuZnSOD* 酶的活性<sup>[19]</sup>。在 86、87、88 和 89 位氨基酸 (NVTA) 含有一个 N-糖基化位点, 在 3 位氨基酸 (T) 处含有一个 O-糖基化位点。翻译后糖基化涉及蛋白质结构和功能的改变, *CuZnSOD* 糖基化引起酶的活性降低, 从而导致糖尿病病人的生理问题<sup>[20-22]</sup>。Jackson 等<sup>[23]</sup> 研究表明 *CuZnSOD* 基因的缺失将导致小鼠骨骼肌的肌肉萎缩, 但是具体信号转导路径还有待进一步研究。

Real-time PCR 结果显示, *CuZnSOD* 基因在猪 12 种组织中均有表达, 这与 Xu<sup>[24]</sup> 等研究结果一致。*CuZnSOD* 基因表达具有广谱性, 说明 *CuZnSOD* 蛋白保护细胞免受自由基的侵害, 它是一个大量存在的抗氧化酶。本研究所检测的组织中表达水平存在明显差异, 在肾中表达丰度最高, 而在心脏和肌肉组织中相对较低。相对心脏和肌肉, 肾脏是产生大量自由基的主要场所<sup>[2]</sup>。研究提示 *CuZnSOD* 基因表达与体内自由基的产生有关。Xu 等<sup>[24]</sup> 的研究结果表明, 42 日龄猪 *CuZnSOD* 表达量最高的组织是肌肉, 但本研究肌肉组织的表达量相对其他组织较低, 说明 *CuZnSOD* 表达量与年龄体重相关, 不同的生长阶段 *CuZnSOD* 在组织中的表达模式不同。至于在各种组织中表达水平的高低则与猪的各个组织内的调控网络有关, 另外与健

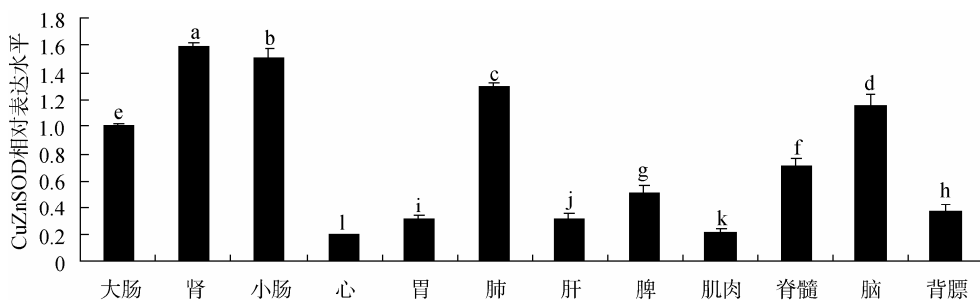


图 3 猪不同组织中 *CuZnSOD* 基因的相对表达量  
不同的标记字母表示 *CuZnSOD* 基因表达水平差异显著 ( $P < 0.05$ )。



康状况、饲喂条件等外在因素有关, 因此推测各个组织中的表达在不同氧化应激情况下也是变化的。

本研究克隆得到猪 *CuZnSOD* cDNA 全长序列, 长度为 658 bp(GU944822), 包含了完整的 CDS 结构, 编码 153 个氨基酸, 它们的氨基酸序列中含有 *CuZnSOD* 家族特有的保守序列元件。生物信息学分析它与其他哺乳动物序列相比具有高度的同源性。猪 *CuZnSOD* 在各种组织中的表达量存在差异。猪 *CuZnSOD* 的克隆和表达分析为进一步研究基因功能奠定基础。

### 参考文献(References):

- [1] 李华, 曾勇庆, 魏述东, 陈其美, 宋一萍, 钱源, 董彬, 崔志锋. 猪宰后肌肉 SOD 与 MDA 的变化及其对肉质特性的影响. 畜牧兽医学报, 2010, 41(3): 257–261.
- [2] 傅晓龙, 刘洪珍. 运动性肾组织氧化损伤与抗氧化能力. 中国临床康复, 2006, 10(36): 123–125.
- [3] Lu M, Daret KSC. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biol Med*, 2009, 47(4): 344–356. [\[DOI\]](#)
- [4] Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biol Med*, 2005, 38(11): 1433–1444. [\[DOI\]](#)
- [5] Carter AB, Tephly LA, Venkataraman S, Oberley LW, Zhang Y, Buettner GR, Spitz DR, Hunninghake GW. High levels of catalase and glutathione peroxidase activity dampen  $H_2O_2$  signaling in human alveolar macrophages. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 2004, 31(1): 43–53. [\[DOI\]](#)
- [6] Bowler C, Van MM, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 83–116. [\[DOI\]](#)
- [7] Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase-applications and relevance to human diseases. *Med Sci Moint*, 2002, 8(9): 210–215.
- [8] Wang CL, Wu CJ, Wang YR, Chen MH, Chen ZQ, Tian SR. Study progress of Cu/Zn superoxide dismutase—from gene to function. *Progr Modern Biomed*, 2008, 8(5): 940–943.
- [9] Folz RJ, Guan J, Seldin MF, Oury TD, Enghild JJ, Crapo JD. Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 1997, 17(4): 393–403.
- [10] Hausmann DH, Porstmann T, Weber I, Hausmann S, Dummmler W, Liebe S, Emmrich J. *CuZnSOD* in human pancreatic tissue and pancreatic juice. *Int J Gastrointest Cancer*, 1997, 22Gastroi: 207–213.
- [11] Akbar SA, Nicolaides KH, Brown PR. Measurement of *CuZnSOD* in placenta, cultured cells, various fetal tissues, decidua and semen by ELISA. *J Obstet Gynaecol*, 1998, 18Gastroi: 331–335. [\[DOI\]](#)
- [12] Robert DB, Dan WH, Robert AC, Clark BJ. *GAPDH* as a housekeeping gene: analysis of *GAPDH* mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 2005, 21(3): 389–395. [\[DOI\]](#)
- [13] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. [\[DOI\]](#)
- [14] Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 1994, 263(5150): 1128–1130. [\[DOI\]](#)
- [15] Malinowski DP, Fridovich I. Chemical modification of arginine at the active site of the bovine erythrocyte superoxide dismutase. *Biochemistry*, 1979, 18(26): 5909–5917. [\[DOI\]](#)
- [16] Borders CL, Saunders JE, Blech DM, Fridovich I. Essentially of the active site arginine residue for the normal catalytic activity of Cu/Zn superoxide dismutase. *Biochem J*, 1985, 230(3): 771–776.
- [17] Chaturvedi S, Hamilton AJ, Hobby P, Zhu G, Lowry CV, Chaturvedi V. Molecular cloning, phylogenetic analysis and three-dimensional modeling of Cu/Zn superoxide dismutase from three varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Gene*, 2001, 268(1–2): 41–51. [\[DOI\]](#)
- [18] Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Cell Biology*, 1992, 89(21): 10405–10409.
- [19] Csar XF, Wilson NJ, Strike P, Sparrow L, McMahon KA, Ward AC, Hamilton JA. Copper, zinc superoxide dismutase is phosphorylated and modulated specifically by granulocyte-colony stimulating factor in myeloid cells. *Proteomics*, 2001, 1(3): 435–443. [\[DOI\]](#)
- [20] Arai K, Iizuka S, Tada Y, Oikawa K, Taniguchi N. Increase in the glucosylated form of erythrocyte Cu/Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glucosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 924(2): 292–296.
- [21] Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N. Glycation and inactivation of human Cu, Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycation sites. *J Biol Chem*, 1987, 262(35): 16969–16972.
- [22] Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *J Sports Sci Med*, 2002, 1(1): 1–14.
- [23] Jackson MJ. Lack of *CuZnSOD* activity: A pointer to the mechanisms underlying age-related loss of muscle function, a commentary on "Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy". *Free Radical Biol Med*, 2006, 40(11): 1900–1902. [\[DOI\]](#)
- [24] Xu, CL, Wang YZ, Guo J, Liu JX, Feng J. Comparison of age-related differences in expression of antioxidant enzyme mRNA and activity in various tissues of pigs. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 147(3): 445–451.